кого варианта в возникновении массовых абортов. Полученные данные позволяют предположить, что заражение полевым вирусом РРСС, вызвавшее аборты, произошло в конце 2001 г. или в начале 2002 г., однако, циркуляция полевого вируса европейского варианта в хозяйстве была значительно раньше, о чем свидетельствовало увеличение инцидентности после введения в основное стадо «польских» свиней.

На основании полученных данных можно сделать следующие предположения о роли вируса РРСС и вспышках абортов в свинокомплексе в 2001-2002 гг.:

1. Вирус РРСС европейского варианта, несмотря на регулярную вакцинацию инактивированной вакциной циркулировал у свиноматок и хряков комбината № 2 до вспышки абортов, т.е. до 2001 г. Несмотря на отсутствия перекрестного иммунитета, индуцированного вирусом американского варианта против вируса европейского варианта, возможно, применяемая вакцина препятствовала распространению резиденского вируса в стаде свиноматок.

2. В результате инфицирования серонегативных свинок «Hypur» в производственном стаде резиденским вирусом привело к изменению его патогенности (геморрагическое воспаление пупочных канатиков) и популяционный иммунитет (по серологическим данным не более 50%) уже не препятствовал передаче вируса «свиноматка-свиноматка»;

3. На «поддержание», продолжительность персистенции вируса и инцидентность абортов оказали влияние отсутствие технологического разрыва на участках № 1, 2 т.е. «пусто-занято», высокий процент замен ремонтными свинками, использование хряков-пробников, в том числе для случки.

УДК 619:616.993.1:636.2

А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, К.К. Бейсембаев, Л.В. Кумпан
ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, ФГУ НИИПОИ Роспотребнадзора

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ АНАПЛАЗМОЗА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Анаплазмоз (гранулоцитарный эрлихиоз) наносит большой экономический ущерб животноводству, который складывается из снижения мясо-молочной продуктивности, снижения качества и количества продуктов животного происхождения, ущерб от недополучения молодняка и гибели животных.

Основной хозяин возбудителя болезни – Anaplasma marginale –крупный рогатый скот. Анаплазмы локализуются в эритроцитах, иногда их находят в лейкоцитах и тромбоцитах. При исследовании мазков крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, обнаруживают круглые включения величиной 0,2-1,2 мкм темнофиолетовогоо цвета. Располагаются в эритроцитах (преимущественно на периферии, иногда ближе к центру). В одном эритроците может быть от одного до четырех включений. Пораженность эритроцитов составляет 3-40%, иногда до 80% [1]. По морфологии анаплазмы в световом микроскопе напоминает кокковидные формы риккетсий. Анаплазмы как и риккетсии, являются внутриклеточными паразитами, однако, первые размножаются в эритроцитах или в фагосомах лейкоцитов, а вторые – в цитоплазме эндотелиальных и мезотелиальных клеток [3]. В частности, Yasuko Rikihisa (1996) пишет, возбудитель A. marginale поражает клетки гранулоцитарного ряда и относит его к эрлихиям. За основу систематизации эрлихий, она берет локализацию возбудителя в клетках крови.

По другим данным отечественной и зарубежной литературы, возбудители анаплазмоза имеют близкое родство с эрлихиями, они относятся к одному и тому же семейству Anaplasmataceae.

Выполненные в последние годы исследования позволили выяснить, что анаплазмы, эперитрозооны, гемобартонеллы и некоторые другие микроорганизмы по своей структуре принципиально отличаются от простейших, к которым их относили

длительное время. Анаплазмы не имеют истинного ядра и органелл, свойственных простейшим, т.е. они являются доядерными организмами. Поэтому их относят к царству Prokariota. Особенности строения этих организмов свидетельствует об их близости к риккетсиям (порядок Ricketsiales). Сюда же входит род Aeguptianella (паразиты птиц). Эперитрозооны и гемобартонеллы относятся к порядку Mycoplasmatales. В порядок Spirochaetales входят боррелиии, трепонемы, спирохеты. Все эти группы микроорганизмов объединяют тип Protophyta [2].

С помощью электронного микроскопа было установлено, что анаплазмы состоят из нескольких «инициальных тел» (Ristic, 1960). В.М. Петешев (1969) такие скопления паразитов назвал колониями [5], а Л.П. Дьяконов и А.А. Авакян (1970) – микроколониями. Ristic (1960), изучив A. marginale с помощью электронного микроскопа, пришел к выводу, что анаплазмы в процессе развития имеют три формы: 1. классическое тело – включение (0,3-1мк); 2. инициальное (начальное) тело, или частичка классического включения (0,3-0,4 мкм); 3. полигедральное тело – частичка инициального тела (0,09-0,12 мк). При этом он отмечает, что «инициальные тела» инвазионы, т.е. им присущи все признаки самостоятельного паразита [4].

Многие виды риккетсий и эрлихий патогенны для человека и животных, что определяет их медицинское и ветеринарное значение. Порядок Rickettsiales принадлежит к альфа дивизиону класса Proteobacteria домена Bacteria и объединяет преимущественно альфа 1 протеобактерии семейств Rickettsiaceae (рода Rickettsia и Orientia) и Anaplasmataceae (Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia и Wolbachia). Следовательно, порядок Rickettsiales объединяет альфа 1 протеобактерии шести родов – Rickettsia, Orientia, Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia и Wolbachia [6].

Анаплазмы размножаются простым делением и почкованием, формируя колонии из 2-8 особей. При электронно-микроскопическом исследовании анаплазм обнаружены так называемые инициальные тельца, состоящие из микроколоний, окруженные двухслойной плазменной оболочкой. Эти тельца могут переходить из эритроцитов через мембрану и снова внедряться в здоровые эритроциты [7].

Противоречивые данные литературы предопределили цель наших исследований: изучить основные биологические свойства возбудителя анаплазмоза, выделенного из патологического материала от крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. установить локализацию анаплазм в клетках крови крупного рогатого скота (коров и телят);

2. изучить ультраструктуру анаплазм;

3. определить морфологические и генетические свойства выделенных анаплазм.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили мазки крови из вены уха коров и телят, больных анаплазмозом и подозреваемых в заражении, а также патологический материал (селезенка) от погибших животных. Мазки крови окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Микроскопирование проводили при помощи светового микроскопа МБИ-15 с иммерсионным объективом при увеличении (100х15). Интенсивность паразитемии определяли количеством анаплазм в 100 полях зрения (п./з.) микроскопа в%. Ультраструктуру анаплазм изучали в электронном микроскопе ЭМ-125.

Культуральные свойства анаплазм изучали в процессе выделения и культивирования их на культуре клеток Vero.

Патологический материал (для ПЦР) помещали в специальный лизирующий буфер (4-х молярный гуанидин - изоционат) в полистероловых пробирках по 200 мкл. Двухраундовую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на родоспецифичных праймерах и последующее секвенирование положительных образцов ДНК проводили совместно с сотрудниками Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, депонент Genbank AY649325.

Результаты исследования

В окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках анаплазмы обнаруживали в виде одного, двух, реже трех в одном эритроците розовато-фиолетовых точкоподобных включений округлой, овальной формы. Расположение в эритроците - преимущественно периферическое, иногда эксцентричное (рис. 1).

Анаплазмы в период носительства и в начале заболевания были округлой формы и одинаковой величины. В период клинического переболевания анаплазмы приобретали разнообразные формы – угловатую, мельчайших точек и делящихся форм.

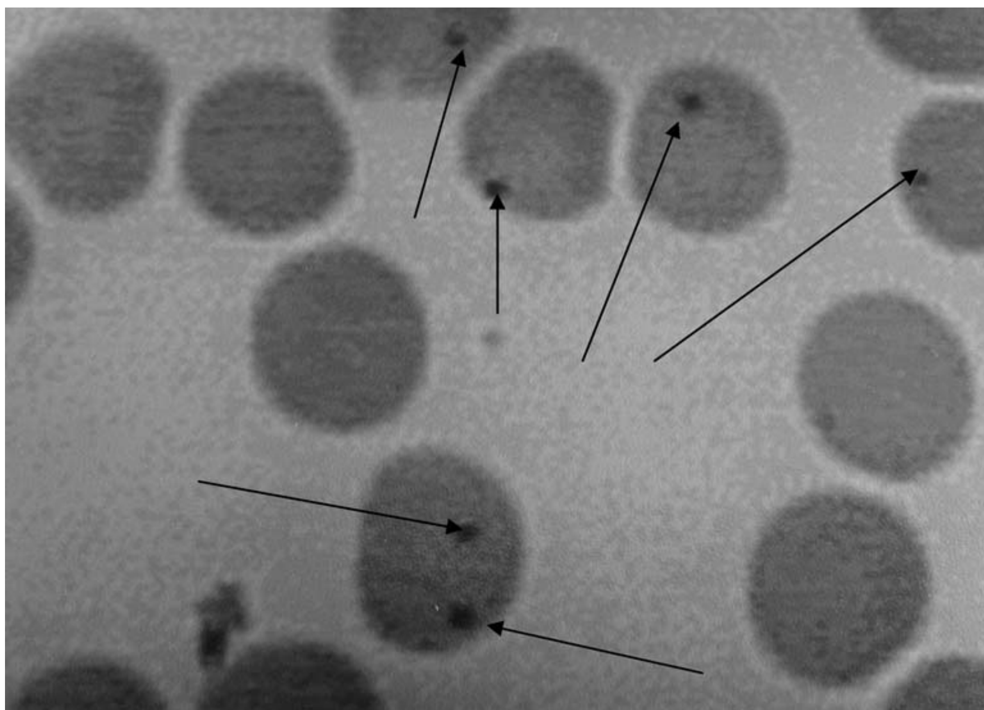


Рисунок 1. Эритроциты крупного рогатого скота инфицированные анаплазмами

Изучение культуральных и субмикроскопических свойств анаплазм. В качестве биологической модели для культивирования и изучения анаплазм, нами была использована культура клеток Vero (рис. 2). На вторые – третьи сутки выращивания отмечали дегенеративные изменения клеток (рис. 3). Показано, что с каждым пассажем происходит накопление количества анаплазм в культуре клеток Vero с 30 м.т. в 100 п./з. в первые сутки до 90 м.т. на 7 сутки, с незначительным уменьшением на 8 сутки (рис. 4).

Изучение субмикроскопической структуры анаплазмозных клеток проводили в ультратонких срезах. При просмотре срезов обращали внимание на форму анаплазм, которая обычна была округлой или овальной.

На рисунке 5 изображена клетка культуры Vero пораженная возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота (A.sp. Omsk). Клеточная структура нарушена, а цитоплазма содержит большое количество анаплазмозных «морул» различной величины и формы. Цитоплазматическая мембрана клетки Vero истончена и местами разорвана. Морулы содержащие A.sp.Omsk располагаются как в цитоплазме клеток, так и за ее пределами.

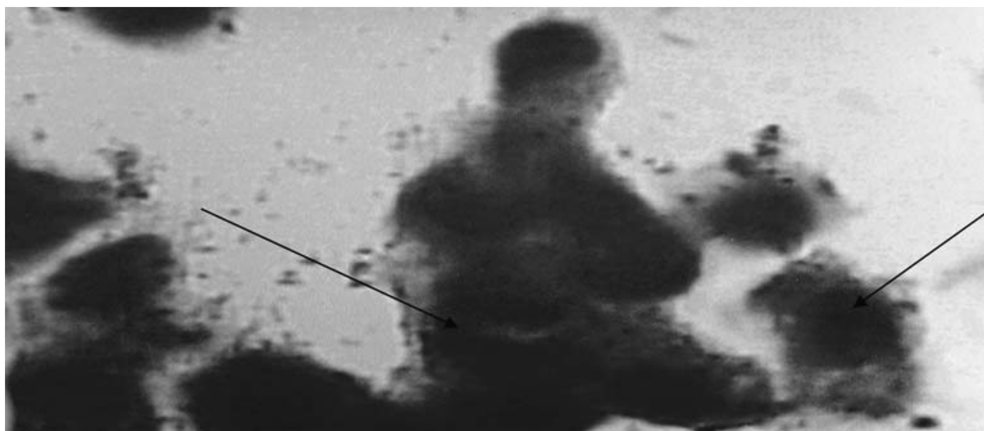


Рисунок 2. Клетки Vero до заражения анаплазмами

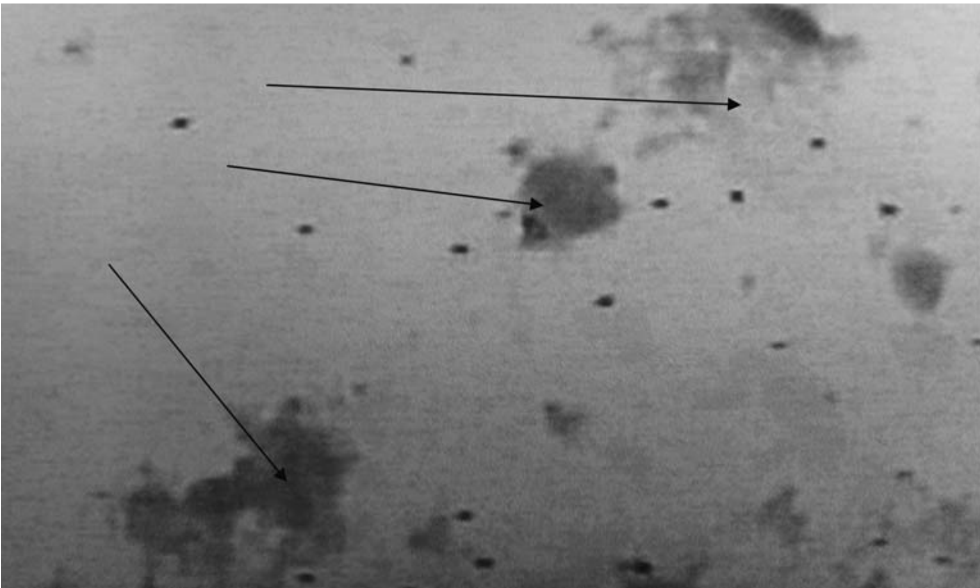


Рисунок 3. Дегенеративные изменения в клетках Vero, после заражения анаплазмами

Возбудитель поражает не только цитоплазматическое пространство, но и проникает в ядро клетки, разрушая ядерную оболочку.

Установлено (рис. 6), что анаплазмы окружены плотной непроницаемой морулой (двухслойная цитоплазматическая мембрана), внутри которой находятся «инициальные тельца», каждая из которых окружена тонкой наружной и внутренней мембраной. Мелкие микроколонии состояли из одной - двух особей, а более крупные из нескольких. При наличие двух паразитов колонии имели вытянутую форму, трех – треугольную, четырех – четырехугольную, свыше четырех – округлую.

Анаплазмы размножаются простым делением и почкованием, формируя колонии из 2-8 особей. Рисунок 7 демонстрирует формирование поперечных трубчатых структур и перетяжек, что указывает на деление анаплазмозных клеток. Ультрас-

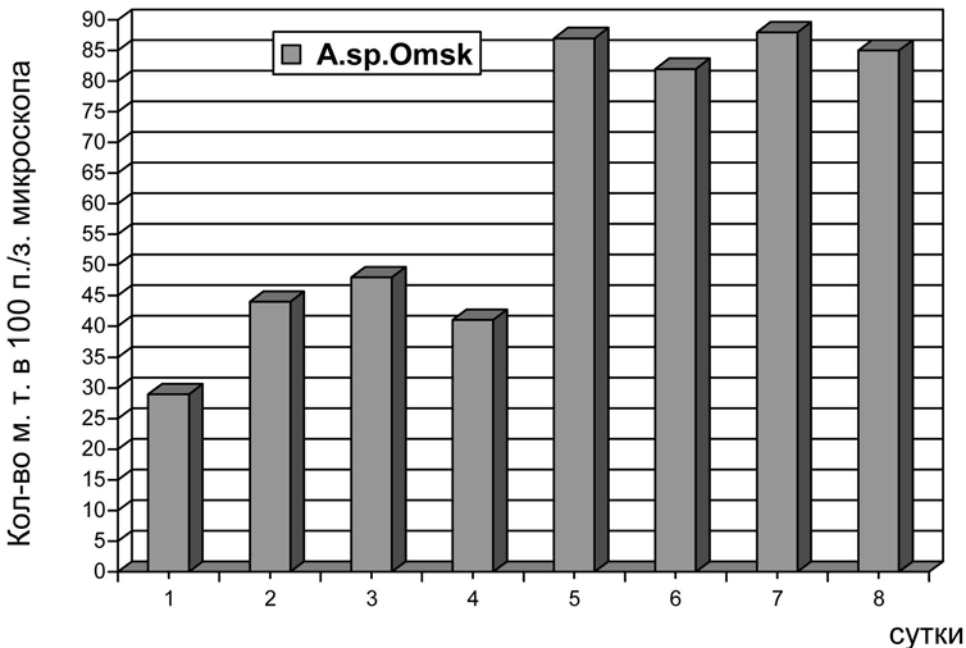


Рисунок 4. Уровень накопления анаплазм в культуре клеток Vero

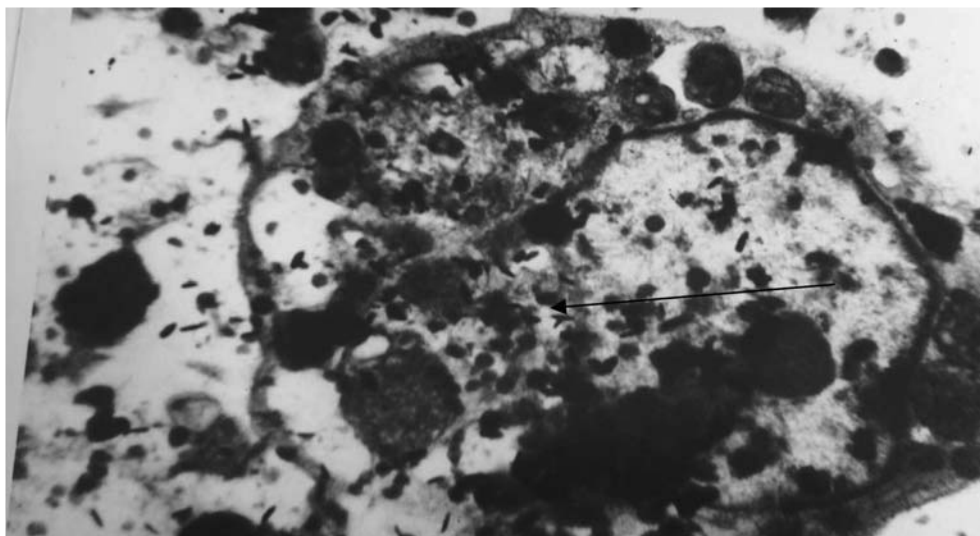


Рисунок 5. Анаплазмозные включения внутри цитоплазмы и ядра

труктура анаплазмозных клеток представлена протопластическими пучками в периплазмотическом пространстве, скоплениями рибосом (темные свободные пространства), тонкими нитями ДНК (светлое свободное пространство), трубчатыми и везикулярными образованиями (рис. 8).

Результаты изучения морфологии паразитов размножающихся in vitro, с учетом наблюдений Ristic (1960) позволили нам сделать заключение, что анаплазма, состоящая из нескольких «инициальных тел», представляет собой не одного паразита, а целую колонию.

Генетические особенности возбудителя анаплазмоза. При проведении двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии родоспецифичных праймерах среди образцов ДНК из селезенок клинически больных анаплазмозом коров (СПК «Такмык» Большереченский район) и телят (ЗАО «Колос» Павлоградского района) анаплазмы были обнаружены во всех образцах.

В образцах от телят положительный сигнал был только после второго раунда ПЦР, а в образцах от крупного рогатого скота был сильный положительный сигнал и после первого раунда ПЦР. Положительные образцы ДНК из селезенок телят и коров были подвергнуты секвенированию. Сравнительный анализ нуклеотид-

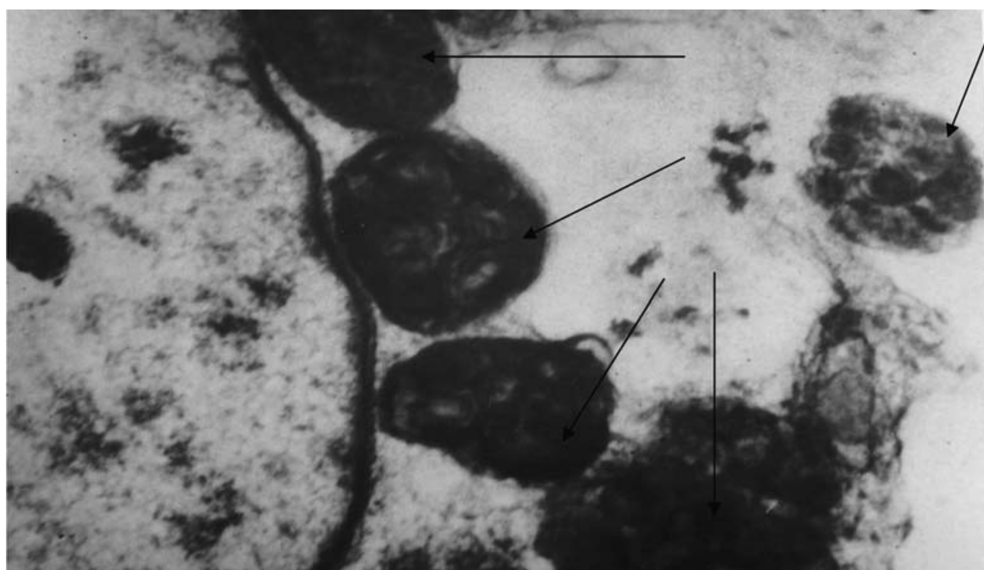


Рисунок 6. Микроколонии (морулы) содержащие A.sp.Omsk (x15000)

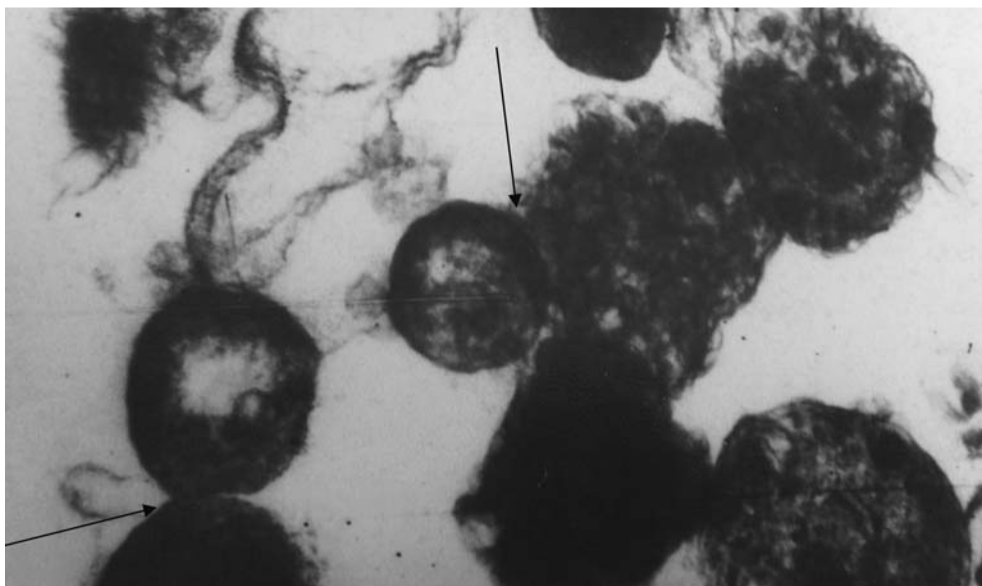


Рисунок 7. Деление анаплазмозных клеток (х10000)

ных последовательностей фрагмента гена 16s рРНК, показал, что данные образцы ДНК, отличались от ДНК Anaplasma marginale и Anaplasma centrale.

Данная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК (AY649325) «Anaplasma sp. Omsk» была депонирована в Международном компьютерном банке данных Genbank. (AUTHORS: Rar V.A., Bejsembaev K.K., Rudakov N.V., Krasikov A.P., Morozova O.V.).

Выводы

1. Анаплазмы локализуются в эритроцитах (чаще всего по их периферии) крови крупного рогатого скота и имеют круглую и овальную формы.

2. Клетки Vero можно использовать для выделения анаплазм из патологического материала животных и изучения их основных биологических свойств. При этом наиболее высокий уровень накопления анаплазм в клетках Vero 85-90 м.т. в 100 полях зрения (85-90% паразитемии) достигает на 5, 7 сутки после культивирования.

3. Анаплазмы окружены плотной непроницаемой морулой (двухслойной цитоплазматической мембраной) внутри которой находятся «инициальные тельца». Колонии состоят из двух и более особей. При наличии двух паразитов они имеют вытянутую форму, трех-треугольную, четырех-четырехугольную, свыше четырех- округлую.

4. Ультраструктура анаплазм представ-

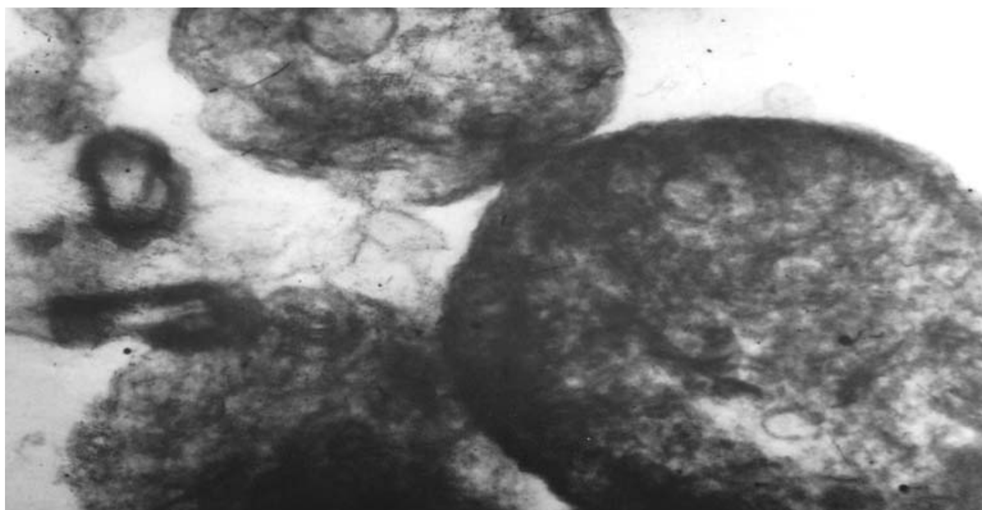


Рисунок 8. Ультраструктура анаплазмозных клеток (х30000)

лена протопластическими пучками в периплазматическом пространстве, скоплением рибосом, тонкими нитями ДНК, трубчатыми и везикулярными пространствами.

5. Размножение анаплазм происходит простым делением и почкованием.

6. С помощью ПЦР секвенирования установлены генетические особенности анаплазм выделенных из патологического материала от крупного рогатого скота в Омской области. При этом нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16s рРНК (AY649325) «Anaplasma sp. Omsk» отличается от таковой Anaplasma marginale и Anaplasma centrale, т.е. Anaplasma sp. Omsk является самостоятельным представителем анаплазм, выделенном в Западной Сибири.

РЕЗЮМЕ

Из патологического материала (селезенок) клинически больных анаплазмозом коров и телят в двух хозяйствах Омской области выделены анаплазмы. Изучены их основные биологические, ультраструктурные и генетические свойства. По нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s рРНК AY649325 «Anaplasma sp. Omsk» является новым представителем анаплазм, выделенном в Западной Сибири.

RESUME

Bovine strain of new anaplasma strain «Anaplasma Omsk» was isolated from cattle in West Sibiria. Anaplasmae were detected in bovine erythrocytes. Ultrastructure and morphology, genetic properties were cultivated in Vero cells lines with cumulation of morulae. Intraphagosomic cycles of development were detected by electron microscopy. Comparative analysesi of sequences of 16s rRNAgene fragment showd differeases of DNA «Anaplasma Omsk» from DNA A. marginale and A. centrale.

Литература

1. Г.С. Дзасохов. Диагностика протозойных болезней животных. М.: Сельхозгиз, 1959. 245 с.
2. Л.П. Артеменко. Анаплазмоз крупного рогатого скота // Ветеринария. 1974. № 12. С. 57-58.
3. О. П. Ананьев, Т. Т. Сулейменов. Получение растворимых антигенов A. ovis различными методами // Эпизоотология, иммунитет, диагностика и химиопрофилактика паразитов сельскохозяйственных животных в Казахстане. Алма-Ата, 1984. С. 3-8.
4. Ristic M. Infectious blood diseases of man and animals, 1960. Vol. 2. P. 5-8.
5. В. М. Петешев. Анаплазмы и анаплазмоз овец. Алма-Ата: Наука, 1975. 237 с.
6. Г. Г. Гасанов. Некоторые вопросы эпизоотологии и лечения анаплазмоза крупного рогатого скота в Азербайджанской республике: автореф. дис. канд. вет. наук. Баку, 1968. 18 с.
7. М.Ш. Акбаев. Паразитология и инвазионные болезни животных. М.: Колос, 1998. 472 с.

УДК 619:616.993.1:535.42:636.2

А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, К.К. Бейсембаев, И.Е. Самойленко

ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, ФГУ НИИПОИ Роспотребнадзора

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КЛЕЩЕЙ В ПЕРЕДАЧЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНАПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Одним из важнейших моментов в борьбе с инфекционными болезнями является установление фактора передачи возбудителя инфекции – одного из звеньев в эпизоотической цепи.

Учитывая роль иксодовых клещей как среды обитания Rickettsiales, экспериментальное изучение их взаимоотношений имеет существенное значение для познания закономерностей существования природных очагов.

Во время питания клещей кровью животных анаплазмы проникают в их кишечник, где и размножаются. Передача анаплазм происходит трансфазно и трансовариально [1].

Гранулоцитарный эрлихиоз человека – это трансмиссивное зоонозное, остролихорадочное заболевание, передающееся при присасывание клещей и часто приводящее к летальному исходу. Клинические признаки болезни: синдром интоксикации, поражения органов и гематологические нарушения, зависящие от вида возбудителя. Длительное время считалось, что эрлихии вызывают болезни только у животных и не представляют опасности для человека. В настоящее время доказано развитие у человека трех заболеваний, вызываемых эрлихиями – эрлихиоза Сеннетсу (Neorickettsia sennetsu), моноцитарного эрлихиоза (Ehrlichia chaffeensis) и гранулоцитарного эрлихиоза (Anaplasma phagocytophila) [2].

В последнее время благодаря широко-